Studien über das Anthokyan

(I. Mitteilung)

von

Dr. Viktor Grafe.

Aus dem pflanzenphysiologischen Institute der k. k. Universität in Wien.

(Mit 1 Tafel.)

(Vorgelegt in der Sitzung am 21. Juni 1906.)

Seitdem Ch. Marquart[1] die roten und blauen Farbstoffe in Blüten und Blättern, welche durch Säuren rot, durch Alkalien blau und schließlich grün gefärbt werden, als »Anthokyan« bezeichnet hatte, ist man daran gewöhnt, die genannten Farbstoffe bloß auf das Kriterium dieses Farbenumschlages hin als identisch zu betrachten, ohne auf ihre sonstige Individualität Rücksicht zu nehmen. So ist das »Anthokyan« mit der Zeit fast ein Individualbegriff geworden, statt ein Klassenbegriff zu sein. Unter den ersten äußerte sich schon Wiesner[2] dahin, daß im Anthokyan schwerlich ein chemisches Individuum vorliege, »dem sowohl das Rot der *Fuchsia* als jenes der *Portulaca* unterzuordnen sei«. Weigert[3] klassifiziert die Farbstoffe der Anthokyangruppe nach ihrem Verhalten zu basischem Bleiacetat, Säuren und Basen. Er unterscheidet danach eine »Weinrot«-gruppe, deren Farbstoffe mit basischem Bleiacetat blaugraue

[1] Ch. Marquart, Farben der Blüten (1835); nach Czapek, Biochemie der Pflanzen, I.

[2] Wiesner, Einige Beobachtungen über Gerb- und Farbstoffe der Blumenblätter. Bot. Zeitg. (1862), 20, p. 392.

[3] Weigert, Beiträge z. Chemie der roten Pflanzenfarbstoffe. Jahresber. 1894/95 der k. k. önolog. und pomolog. Lehranstalt Klosterneuburg.

bis blaugrüne Niederschläge liefern, mit konzentrierter Salzsäure sich hellrot färben und einen Niederschlag geben, bei Zusatz von Alkali endlich genau am Neutralitätspunkte über Blau in Grün umschlagen. Die Farbstoffe der »Rübenrot«gruppe geben mit basischem Bleiacetat rote Niederschläge, Salzsäure färbt violett, ebenso aber auch Ammoniak, Kalilauge dagegen gelb. Da die folgenden Untersuchungen sich hauptsächlich auf den Malvenfarbstoff beziehen, welcher im großen ganzen der »Weinrot«gruppe zuzurechnen ist, soll über das »Rübenrot« vorläufig nichts gesagt werden. Diese scharfe Trennung der Pigmente der Anthokyangruppe ist jedoch nicht konsequent durchführbar. Auf diesen Umstand macht Molisch[1] in einer hochinteressanten Arbeit aufmerksam, indem beispielsweise der Farbstoff von *Dianthus Caryophyllus* in keine der beiden Gruppen seinen Reaktionen nach streng einzureihen ist. Dieser Beobachtung kann ich vorausgreifend die Tatsache anschließen, daß auch der Malvenfarbstoff mit konzentrierter Salzsäure nicht heller rote, sondern dunkelrote Färbungen liefert, daß diese Farbe beim Versetzen mit Ätzkali oder Ätznatron in Dunkelblau und bei einem geringen Überschuß schnell in Grün übergeht. Mit Ammoniak hingegen entsteht sofort die grüne Farbe. Dieser Farbenumschlag erfolgt jedoch nicht genau am Neutralitätspunkt, sondern es ist noch die rotviolette Farbe erhalten, wenn die Lösung gegen Lackmustinktur bereits deutlich alkalisch reagiert, so daß also der Malvenfarbstoff wenigstens als Indikator nicht so brauchbar ist wie Lackmus. Die Farbe des Bleiacetatniederschlages ist verschieden, je nachdem man mit neutralem oder basischem Bleiacetat fällt, blau mit neutralem, grünlichblau mit basischem Bleiacetat. Czapek[2] nimmt an, daß die blaue Farbe den einwertigen, die grüne Färbung den zweiwertigen Ionen der Farbstoffsäure zukommt, während die nicht dissoziierten Moleküle der freien Säure rote Farbe besitzen. Wiesner[3] sprach die Anschauung aus, daß die Anwesenheit von Gerbstoffen die grüne Färbung von Anthokyanlösungen

---

[1] H. Molisch, Über amorphes und kristallisiertes Anthokyan. Bot. Zeitg., 1905, H. VII/VIII, p. 159.

[2] Biochemie der Pflanzen, I, 472.

[3] Wiesner, l. c.

mit Alkalien bedinge, eine Anschauung, welche durch die Overton'schen[1] Arbeiten, nach welchen die Anthokyane glykosidartige Gerbstoffverbindungen darstellen, gestützt wird. Diese Hypothese scheint mir aber trotzdem nicht völlig stichhältig zu sein, weil, abgesehen von den schon erwähnten Reaktionen mit Bleiacetat, die Möglichkeit der Darstellung einer reinblauen Alkaliverbindung vorliegt, welche später beschrieben wird, weil ferner nach völliger Hydrolyse des Farbstoffglykosids mit verdünnter Schwefelsäure, wenn Fehling'sche Lösung keinen Niederschlag mehr gibt, trotzdem dieselben Farbenreaktionen wie vorher auftreten und weil der Niederschlag mit Eisenchlorid, welcher allerdings auch in Lösungen des Malvenfarbstoffes auftritt, noch kein hinlängliches Kriterium für Gerbstoff abgibt, sondern auch auf Rechnung von aromatischen Komplexen, die sich im Anthokyan nachweisen lassen, fallen kann. Coffeïn und Antipyrinlösungen, diese Niederschlagsreagenzien für Gerbstoffe, erzeugen übrigens in den Auszügen des Malvenfarbstoffes keinen Niederschlag. Im übrigen weist Wiesner[2] darauf hin, daß nicht nur Gerbstoffe, sondern auch andere Substanzen die gelbe Nebenfärbung und infolgedessen mit dem reinen Blau des alkalischen Anthokyans die Mischfarbe Grün geben können. Nun ist wohl zweifellos, daß sich in jeder Pflanzenzelle Substanzen finden, die sich mit Alkalien gelb färben. Wiesner stützt sich dabei auf die Beobachtung, daß sich anthokyanführende Zellen mit einer Spur Alkali blau färben, daß aber bei einem kleinen Überschuß an Alkali die grüne Färbung auftritt, indem dann die sich mit Alkali gelb färbenden Zellinhaltsstoffe die Farbe in der angegebenen Weise zu modifizieren beginnen. In besonders ausgezeichneter Weise zeigen dieses Verhalten rote Blüten von Pflanzen, die auch rein weiße Varietäten aufweisen, z. B. die Schafgarbe. Während die weißen Blüten mit Alkalien gelb werden, färben sich die roten mit Alkali grün. Wiesner faßt dann folgerichtig diese Grünfärbung als Mischfarbe aus Blau und Gelb auf und es ist wohl zweifellos, daß der grüne Farbenton des Anthokyans in der

[1] Overton, Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. XXXIII (1899).

[2] Anatomie u. Physiologie der Pflanzen. Wien 1898, p. 63.

Pflanzenzelle durch andere Zellinhaltsstoffe, die sich mit Alkalien gelb färben, modifiziert werden kann.

Mit Ammoniak tritt, wie erwähnt, sofort grüne Färbung, respektive Fällung ein. Wurde aber der neutrale alkoholische Auszug vorher mit verdünnter Schwefelsäure oder Salzsäure angesäuert und dann ein Überschuß von wässerigem Ammoniak hinzugefügt, so zeigt die Flüssigkeit beim Schütteln an der Eprouvettenwand und in der Aufsicht grüne Färbung, erscheint aber in der Durchsicht durchaus dunkelrot. Eisenchlorid erzeugt in der neutralen alkoholischen Auflösung des Farbstoffes blauviolette Fällung, ebenso in schwach sauren Lösungen. Ein Überschuß der Säure löst den Niederschlag mit hellroter Farbe. Nach längerem Kochen mit verdünnten Säuren geben die Farbstofflösungen keinen Niederschlag mit Eisenchlorid, mit Alkalien allerdings momentane grüne Fällungen, die aber, entsprechend dem abgespaltenen Zucker, sehr bald in schmutzigbraune Niederschläge übergehen. In der vorhin zitierten Arbeit berichtet Molisch über das Vorkommen von amorphem und kristallisiertem Anthokyan in der lebenden Zelle. Diese interessante Arbeit bewog mich, der Frage nach der chemischen Beschaffenheit des Blütenfarbstoffes näherzutreten. Es gelingt vor allem schwer, ein entsprechendes Ausgangsmaterial zu gewinnen, da die verschiedensten Inhaltskörper der Zelle in die Extrakte mit übergehen und eine Reindarstellung des Farbstoffes illusorisch machen. Die ersten Versuche stellte ich mit *Brassica oleracea* (Rotkraut) an. Die noch zum Kopf zusammenschließenden, fast chlorophyllfreien, stark anthokyanhaltigen Blätter wurden zerrieben und mit Äther ausgekocht. Dann wurden sie im Extraktionsapparat drei Stunden mit destilliertem Wasser behandelt. Die rotviolette Lösung wurde am Wasserbad konzentriert, mit gesättigter Bleiacetatlösung versetzt, der voluminöse grünlichblaue Niederschlag abgesogen, wiederholt mit Wasser und schließlich mit Alkohol gewaschen, in Wasser aufgeschlemmt, gekocht, mit einigen Tropfen Salzsäure angesäuert und heiß durch Einleiten von Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat, vom Schwefelblei zur Trockene abgedampft, wurde mit Alkohol aufgenommen und im Vakuum längere Zeit stehen gelassen. Die Rückstände hatten stets

amorphen Charakter. Als bemerkenswert sei noch erwähnt, daß die Rotkrautblätter, mit heißer schwefeliger Säure im Extraktor behandelt, sich sehr schnell entfärbten, daß aber die rote Farbe beim Erkalten wieder zum Vorschein kam. Selbst wiederholte Fällung mit Bleiacetat und nachfolgendes Zerlegen mit Schwefelwasserstoff gestattet nicht, den Farbstoff in Kristallen zu gewinnen. Das nächste Material, welches in Verwendung genommen wurde, waren die schwarzblauen Beeren von *Ligustrum vulgare*. Die zerquetschten Beeren wurden zunächst mit Äther erschöpft, welcher sich dunkelgrün färbte. Es war aber keine Spur Anthokyan in den Äther gegangen, da die entsprechenden Reaktionen — Rötung durch Säure, Bläuung durch Alkalien — ausblieben. Die Extraktion geschah in einem eigens hiezu konstruierten Extraktor,[1] welcher sich namentlich zur Bewältigung größerer Mengen auch später beim Arbeiten mit Malvenblütenblättern bewährte, weshalb seine Beschreibung hier Platz finden möge. Ein 5 *l* fassender Kolben mit langem breitem Hals trägt am Boden (Taf. I) ein enges Röhrchen angesetzt, welches, am Kolbenbauch aufwärtsgehend, in eine weitere Röhre mündet, die, rechtwinkelig abgebogen, am Kolbenhals angeschmolzen ist. Das engere Röhrchen läuft in dem weiteren konzentrisch bis zu dessen Ende fort, welches sich einige Zentimeter unterhalb des Kolbenbodens befindet. Der große Kolben wird mit dem Extraktionsmaterial gefüllt und mit Rückflußkühler versehen. An das Röhrenende wird mittels eines Stöpsels ein Kolben mit der Extraktionsflüssigkeit so angesetzt, daß die Röhre niemals im Verlaufe der Extraktion in die Flüssigkeit hineinragt. Erhitzt man nun die Extraktionsflüssigkeit, so steigen deren Dämpfe durch das weitere Rohr auf, gelangen in den großen Kolben, verdichten sich und durchziehen das Extraktionsmaterial. Schließlich sammelt sich so viel Flüssigkeit, deren Steigen man in dem engeren Bodenröhrchen beobachten kann, im Kolben an, daß die Luft in dem Röhrchen verdrängt wird und der gesamte Flüssigkeitsinhalt des Kolbens durch automatische Heberwirkung in den angeheizten Kolben gelangt, worauf sich das Spiel von neuem wiederholt, so daß es möglich

[1] Nach meinen Angaben von der Firma Rud. Siebert (Fritz Vogl), Wien, IX., Garnisongasse 9, konstruiert.

wird, mit einer verhältnismäßig geringen Menge von Lösungsmittel größere Quantitäten von Ausgangsmaterial zu extrahieren.

Aus dem grünen Ätherextrakt kristallisiert nach Abdestillieren des Äthers eine weiße Substanz in körnigen Aggregaten, die, aus Äther umkristallisiert, feine Nadeln bildet, welche die Acroleinreaktion zeigten und sich so als Fett dokumentierten, vorläufig aber nicht weiter untersucht wurden. Die mit Äther extrahierten Beeren wurden nun auf dieselbe Weise mit Wasser ausgezogen. Es resultierte ein blauschwarzer Extrakt, der mit einer Spur Säure intensiv rot wurde. Mit Eisenchlorid gab er keine Gerbstoffreaktion, so wie auch die übrigen auf Gerbsäuren angestellten Proben erfolglos blieben. Trotzdem zeigten sich auch hier die gewöhnlichen Alkalifärbungen. Ein Teil des Extraktes wurde am Wasserbade zur Trockene abgedampft. es hinterblieb eine braune, sehr harte Masse, welche, in wenig Wasser gelöst, mit Säuren rot, mit Alkalien aber nicht mehr blau, sondern braun wird. Ein anderer Teil wurde mit basischem Bleiacetat gefällt. Die Flüssigkeit über dem dunkelgrünen Niederschlag war völlig farblos, es war also der gesamte Farbstoff gefällt worden. Die Bleifällung wurde mit Wasser bis zum Verschwinden der Bleireaktion gewaschen, dann in gewohnter Weise mit H_2S zerlegt, das Filtrat vom Schwefelbleiniederschlag am Wasserbad eingedampft. Auch hier zeigte sich dieselbe Erscheinung wie früher. Selbst die wässerige Lösung des Farbstoffes bei Extraktion der Beeren wies dieselbe Empfindlichkeit auf, die sich nach längerer Kochdauer durch Ausbleiben der Alkalireaktion dokumentierte. Es ist das eine sehr charakteristische Verschiedenheit von dem Anthokyan des Rotkrauts, welches gegen Wasserbadwärme völlig unempfindlich ist. Ein dritter Teil des Extraktes wurde, in offenen Kristallisierschalen angesäuert, längere Zeit stehen gelassen, wobei eine sirupöse Masse resultierte, die, mit wenig Wasser aufgenommen, über gereinigte Tierkohle filtriert wurde. Die Tierkohle nimmt den Farbstoff völlig auf, so daß das abtropfende Filtrat farblos erscheint. Die Masse läßt sich mit Alkohol waschen und der Farbstoff mit Wasserdampf extrahieren. Der Rückstand, welcher nach langsamem Abdunsten der Lösung resultiert, stellt eine glänzend schwarze kristallinische Masse dar, welche sich mit

Leichtigkeit in Wasser mit karmoisinroter Farbe löst, in Alkohol aber vollkommen unlöslich ist. Die Elementaranalysen dieser Substanz ergaben trotz weiterer Reinigungsversuche keine übereinstimmenden Resultate, weshalb die Arbeit mit *Ligustrum* vorläufig beiseite gestellt wurde. Ein Versuch mit Rosenblättern verlief ebenfalls resultatlos, da die große Menge von Gerbstoff und Zucker hier die Herstellung des analysenreinen Farbstoffes außerordentlich erschwerte. Der wässerige oder besser alkoholische Extrakt aus Rosenblättern erschien fast farblos und wurde durch eine Spur Säure karmoisinrot.

Ein geeigneteres Material für die Reindarstellung des Farbstoffes bilden die Blüten der Malve *(Althaea rosea)*, deren sich schon früher R. Glan[1] zu demselben Zwecke bedient hatte. Die getrockneten schwarzen Blüten, welche im Handel erhältlich sind, wurden von Kelch und Staubgefäßen befreit und zunächst im Extraktor einer erschöpfenden Behandlung mit wasserfreiem Äther unterzogen, dann zur Vertreibung des Äthers bei 50° getrocknet und hierauf einer Extraktion mit absolutem Alkohol ausgesetzt. Unter dem Mikroskop lassen die dunkel gefärbten Blätter zunächst nichts erkennen. Nach Behandlung mit Essigsäure am Objektträger diffundiert wohl der Farbstoff zum Teile aus der Zelle heraus, aber weder die exosmierten Farbstoffpartikelchen noch auch die in der Zelle zurückgebliebenen lassen kristallisierte Struktur erkennen. Wenn im folgendem vom »Anthokyan« die Rede ist, so bezieht sich alles Gesagte zunächst nur auf den Malvenfarbstoff, denn ich möchte, wiewohl sich enge Beziehungen zwischen diesem und dem von Heise untersuchten Heidelbeer- und Weinfarbstoff herausgestellt haben, doch vorläufig noch an der individuellen Verschiedenheit der verschiedenen »Anthokyane« festhalten.

Im Verlaufe zahlreicher Vorversuche wurde zunächst festgestellt, daß eine Extraktion der Blüten mit Wasser oder verdünnten Säuren untunlich ist, da bei dieser Operation so viel Schleim mit in den Extrakt gelangt, daß an eine Reindarstellung des Farbstoffes nicht gedacht werden kann. Bei dem Versuche,

[1] Über den Farbstoff der schwarzen Malve. Inauguraldissert., Erlangen 1892.

einen solchen schleimhaltigen Extrakt, welcher vor allem nicht filtrierbar ist, durch Kochen mit Alkalien oder Säuren zu hydrolysieren und den gebildeten Zucker mit Phenylhydrazin zu entfernen, machte ich die Erfahrung, daß auch der Farbstoff dabei zerstört werde, jedenfalls traten die charakteristischen Anthokyanreaktionen nicht mehr ein. Ein Niederschlagen des Schleimes mit Alkohol mißlang, weil auch der Farbstoff dabei niedergeschlagen wurde, ebenso verlief ein Aussalzversuch mittels Ammoniumsulfats, respektive Kochsalz resultatlos. Das einzige Verfahren, welches gestattet, den Farbstoff von schleimigen Verunreinigungen frei zu erhalten, ist eben die Extraktion mit absolutem Alkohol. Allerdings gewinnt man dabei nur ziemlich schwach gefärbte Auszüge und die Ausbeute ist eine höchst unbefriedigende. Die Kochdauer beträgt bei jeder Partie etwa 10 Stunden. Die so extrahierten Blätter wurden zur Vergrößerung der Ausbeute in der Regel noch im gewöhnlichen Kolben am Rückfluß ausgekocht. Dabei konnte man an den Kolbenwänden den Farbstoff sich in dünnen Bändern in fester Form rein blau als Kali-, respektive Natronsalz absetzen sehen, da die Lösung beim langen Kochen offenbar eine Spur des Alkalis aus dem Glase aufgenommen hatte oder das Kalisalz direkt aus den Blüten, welche ja nach Glan starken Kaligehalt aufweisen, extrahiert worden war. Der rotviolette Extrakt nahm mit Säuren intensiv rotviolette Farbe an, wird mit Alkalien blau bis blaugrün. Eisenchlorid fällt blauviolette Flocken aus der Lösung. Fehling'sche Lösung reduziert sofort beim Erwärmen. Zur Herstellung des wasserfreien Alkohols wurde der 96prozentige Alkohol mit einer größeren Menge entölten metallischen geraspelten Calciums beschickt, welches sich, abgesehen von dessen neuerdings verhältnismäßig billigem Preis, als Entwässerungsmittel sehr bewährt hat. Der so behandelte Alkohol erwies sich ohne nachfolgende Destillation für meine Zwecke brauchbar und wurde immer mit einem Stückchen durch Sublimat aktivierten Aluminiumblechs geprüft, welches durch die aufsteigenden Gasblasen schon kleine Mengen Wassers anzeigt.

Von dem so hergestellten Auszug wurde der Alkohol zum großen Teil abdestilliert, der Rest mit dem gleichen Volumen

Wasser versetzt und mit basischem Bleiacetat als grüner Niederschlag gefällt, der durch Dekantieren von der farblosen Lösung getrennt wurde. Nachdem er durch Aufgießen von Wasser und wiederholtes Abdekantieren gereinigt worden war, wurde er mit Alkohol nachgewaschen und der Alkohol durch Digerieren mit Äther entfernt. Der mit Wasser suspendierte und mit HCl angesäuerte Niederschlag ward schließlich heiß der H_2S-Behandlung unterworfen. Das vom Schwefelbleiniederschlag gewonnene tiefrote Filtrat wurde zur Entfernung des Schwefelwasserstoffs gekocht und nach der Neutralisation in einer flachen Kristallisierschale unter der Vakuumglocke verdunsten gelassen. Es hinterblieb ein metallglänzendes dunkelrotes Pulver, das sich in Aceton vollständig löste und, nun in eine größere Menge Äthers eingegossen, den Farbstoff in körnigen Flittern ausfallen ließ. Dieser Niederschlag wurde über Asbest filtriert und mit absolutem Alkohol aufgenommen. Es zeigte sich, daß nur ein Teil des Farbstoffpulvers in absolutem Alkohol in der Kälte löslich war. Der zurückbleibende Teil löste sich glatt in Wasser. Die Alkohollösung wurde mit so viel Äther versetzt, bis der Farbstoff sich als brauner Niederschlag abschied, dieser abfiltriert und neuerdings in absolutem Alkohol gelöst. Im Vakuum erschien dieser Farbstoffteil nach Abdunsten des Lösungsmittels in winzigen kristallinischen Blättchen von tiefroter Farbe. Die Wasserlösung wurde ebenfalls im Vakuum eingedunstet, abfiltriert und mit wenig angesäuertem Wasser aufgenommen. Schließlich erhielt ich eine körnige, amorphe Masse, welche nicht zum Kristallisieren gebracht werden konnte, aber trotzdem recht gut aufeinander stimmende elementaranalytische Daten gab. Abgesehen von ihren verschiedenen Löslichkeitsverhältnissen und ihrer Konsistenz unterschieden sich die beiden Farbstoffteile durch ihr Verhalten gegen Säuren. Der alkoholunlösliche, wasserlösliche Teil gibt mit einem Tropfen konzentrierter Salzsäure eine karminrote Färbung, während die gleiche Konzentration des wasserlöslichen Anteils dunkel violettrote Farbe mit Salzsäure gibt. Gegen Alkalien zeigten sie kein ausgesprochen verschiedenes Verhalten, sondern die bezügliche normale »Anthokyan«reaktion. Ein weiterer wesentlicher Unterschied besteht darin, daß die alkohol-

lösliche Form im Gegensatz zur wasserlöslichen Fehling'sche Lösung nicht mehr reduziert und beim Kochen damit in Bezug auf die Farbenreaktionen zerstört wird.

Der Elementaranalyse unterworfen, erwiesen sich beide Körper als stickstofffrei. Die Daten der quantitativen Analyse waren folgende:

I. Alkohollöslicher Anteil:

I. 0·2812 *g* Substanz gaben 0·6197 *g* Kohlensäure und 0·1422 *g* Wasser.

II. 0·1777 *g* Substanz gaben 0·3909 *g* Kohlensäure und 0·0908 *g* Wasser.

In 100 Teilen:

	Gefunden		Berechnet für $C_{14}H_{16}O_6$
	I	II	
C	60·10	59·99	60·00
H	5·62	5·68	5·72
O	34·28	34·33	34·28

II. Wasserlöslicher Anteil:

I. 0·1702 *g* Substanz gaben 0·3127 *g* Kohlensäure und 0·0992 *g* Wasser.

In 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet für $C_{20}H_{30}O_{13}$
C	50·11	50·21
H	6·48	6·27
O	43·41	43·52

II. 0·2043 *g* Substanz gaben 0·3758 *g* Kohlensäure und 0·1160 *g* Wasser.

In 100 Teilen:

	Gefunden	Berechnet
C	50·17	50·21
H	6·36	6·27
O	43·47	43·52

Die Bestimmung des Molekulargewichtes geschah, nachdem beide Anteile sich in flüssigem Phenol als löslich (wenn auch erst beim Erwärmen) erwiesen hatten, durch die Methode der Gefrierpunktserniedrigung nach Eykmann in Phenol als Lösungsmittel:

I. Alkohollöslicher Anteil:

Phenol: 10·2388 *g* } Konstante: 76, entsprechend einer 2·35-
Substanz: 0·2406 *g* } prozentigen Lösung.

Erniedrigung des Gefrierpunktes als Mittel aus drei Bestimmungen: 0·65° C., entsprechend einem Molekulargewicht von

Gefunden	Berechnet für $C_{14}H_{16}O_6$
274	280

wodurch also die obgenannte Summenformel bestätigt erscheint.

II. Wasserlöslicher Anteil, ebenso durchgeführt wie zuvor:

Phenol: 11·2576 *g* } entsprechend einer 2·71 prozentigen
Substanz; 0·3050 *g* } Lösung.

Gefrierpunktserniedrigung: 0·45° C., entsprechend einem Molekulargewicht von

Gefunden	Berechnet für $C_{20}H_{30}O_{13}$
460	478

Die Ergebnisse der chemischen Analyse zeigen also, daß die alkohollösliche Komponente des Farbstoffes sich von der wasserlöslichen durch ein Minus von $C_6H_{14}O_7$ unterscheidet. Man könnte bei der Entstehung des alkohollöslichen Körpers an einen Vorgang, etwa im Sinne der folgenden Gleichung denken: $C_{20}H_{30}O_{13} + H_2O = C_6H_{12}O_6 + C_{14}H_{18}O_8$, woraus $2C_{14}H_{18}O_8 - 2H_2O - O_2 = 2C_{14}H_{16}O_6$ sich ergibt. Ein Bild von einem etwa so verlaufenden Vorgang wird man sich natürlich erst machen können, bis über die Konstitution der fraglichen Körper Näheres bekannt sein wird. Tatsache ist, daß, wie schon früher erwähnt, der wasserlösliche Körper Fehling'sche Lösung

reduziert, also mit einer Monose in Verbindung steht, der andere nicht. Wie schon früher Glan[1] konnte auch ich konstatieren, daß der durch Kochen der wässerigen Lösung mit Schwefelsäure abspaltbare Zucker Dextrose sei, konnte aber auch im Einklang mit dem Genannten die Abspaltung von Furfurol bei der Hydrolyse durch das Schiff'sche Reagens nachweisen. Ich möchte darauf hinweisen, daß Molisch in seiner bereits zitierten Abhandlung (p. 157) Anthokyankristalle von *Pelargonium zonale* und aus der Rose beschreibt, welche er durch Behandeln der betreffenden Blütenblätter mit Essigsäure oder zehnprozentiger HCl erhalten hatte und die sich als in reinem Wasser unlöslich erwiesen. Es liegt nahe, anzunehmen, daß durch die Säurewirkung das vermutliche Anthokyanglucosid gespalten und in eine wasserunlösliche Modifikation übergegangen war.

Hier möchte ich auch erwähnen, daß auch Heise[2] bezüglich des Rotweinfarbstoffes oder vielmehr des Hülsenfarbstoffes der blauen Trauben zu ähnlichen Anschauungen kam wie ich. Auch dort fand Heise zwei differente rote Farbstoffe, die genetisch zusammenhängen und sich durch ihre Löslichkeitsverhältnisse voneinander, wenn auch in etwas anderer Weise, als dies für das Malvenanthokyan gilt, unterscheiden. Der lösliche Farbstoff verwandelt sich nach ihm durch Oxydation in den unlöslichen. Gautier[3] stellte für den Rotweinfarbstoff die Formeln $C_{20}H_{20}O_{10}$ oder $C_{21}H_{20}O_{10}$ auf, welche wohl kaum bedeutenden Wert beanspruchen können, da dieser Forscher mit einem Gemenge der beiden Farbstoffkomponenten gearbeitet hat. Auch im Heidelbeerfarbstoff konnte Heise[4] zwei verschieden lösliche Körper isolieren, welche die Formeln $C_{20}H_{24}O_{12}$, respektive $C_{14}H_{14}O_7$ besitzen, so daß also der eine als das Glucosid des anderen erscheint.

Meine weiteren Untersuchungen erstreckten sich zunächst auf die wasserlösliche Modifikation des Anthokyans, welche in größerer Quantität vorlag.

---

[1] R. Glan, l. c., p. 12.

[2] R. Heise, Arbeiten d. kais. Gesundheitsamtes, V, 618 (1889), Berlin.

[3] Arm. Gautier, Comptes rend., T. 86, p. 1507; T. 114, p. 623.

[4] R. Heise, Arbeiten d. kais. Gesundheitsamtes Berlin, IX, 478 (1894).

Untersuchung des wasserlöslichen Anteils.

Schon die Fällbarkeit der Substanz in Salzform mit verschiedenen Basen zeigt deren saueren Charakter. Wenn man nach dem Vorgang Glan's die wässerige Lösung mit Schwefelsäure ansäuert und sehr vorsichtig mit verdünnter Kalilauge gerade bis zur Neutralfärbung bringt, erhält man nach längerem Stehen der Lösung in der Tat die Kaliverbindung des Farbstoffes als blaugrünen Niederschlag, welcher abfiltriert, gewaschen und bei 100° getrocknet wurde. Der Verbrennung unterworfen, wurde das zurückbleibende Kalicarbonat geglüht und gewogen. Es hinterließen 1·0540 *g* Substanz 0·2477 *g* $K_2CO_3 = 0{\cdot}1400$ K = 13·28 % K. Das stimmt so ziemlich mit der Annahme einer zweibasischen Säure überein, welche bei einer Molekularformel $C_{20}H_{30}O_{13}$ 14·08 % K verlangen würde. Ähnliche, wenn auch nicht ganz so befriedigende Resultate ergab das Aluminiumsalz, welches durch Fällen mit Aluminiumhydroxyd als lichtviolettes Pulver, und das Barytsalz, welches durch Fällen mit kochendem Baryumcarbonat als lichtgelber, beim Trocknen an der Luft bräunlich werdender Niederschlag erhalten wurde. Es möge noch erwähnt werden, daß Glan bei einem Versuch, das Kalisalz des methylalkoholischen Auszuges aus Malvenblättern darzustellen, nur zu der Zahl 6·32 % Kalium kam, was beiläufig auf eine einbasische Farbsäure hindeuten würde, aber wohl nur darauf zurückzuführen ist, daß dieser Forscher mit einem Gemenge beider Komponenten gearbeitet hat. In keinem der Fälle wurden jedoch kristallisierte Salze, sondern stets nur amorphe Farblacke erhalten. Ebenso war es bisher unmöglich, das saure Salz darzustellen und zu analysieren.

Behandlung mit Natriumbisulfit.

Es ist eine lange bekannte Erscheinung, daß rot oder blau gefärbte Blätter, mit wässeriger schwefeliger Säure oder mit SO_2-Dämpfen behandelt, sich entfärben. Dieser Prozeß wird zumeist als Reduktionsprozeß aufgefaßt, so daß durch die reduzierende Wirkung der schwefeligen Säure eine Leukoverbindung des Anthokyans entstehe. So wie die Blüten

anderer Pflanzen zeigen auch Malvenblüten diese Entfärbungserscheinung. Es zeigte sich aber, daß dieselbe Erscheinung auch eintritt, wenn man den alkoholischen Extrakt der Malvenblüten mit frisch bereiteter konzentrierter Natriumbisulfitlösung andauernd, zuletzt unter Erwärmen schüttelt, wobei sich keine schwefelige Säure entwickeln darf. Die ersten Versuche wurden übrigens so durchgeführt, daß zum alkoholischen Extrakt festes $NaHSO_3$ zugefügt und dann unter fortwährendem Schütteln so viel Wasser zugetropft wurde, als zur Lösung notwendig war. Es trat in der Kälte nahezu völlige Entfärbung ein. War es schon unwahrscheinlich, daß es sich bei der Einwirkung der SO_2 um einen Reduktionsprozeß handle, da die Wiederherstellung der roten Farbe nicht beim Kochen oder Stehen an der Luft, sondern erst durch Hinzufügung einer stärkeren Säure stattfand, so war bei der Entfärbung durch $NaHSO_3$ eine Reduktionswirkung noch unwahrscheinlicher und es konnte die Vermutung Platz greifen, daß Additionswirkung durch eine (oder mehrere) Aldehydgruppe oder eine andere Doppelbindung im Molekül die Bindung des $NaHSO_3$ und damit die Bindung der chromogenen Gruppe zur Folge gehabt haben.[1] Eine ähnliche Erscheinung ist ja von der Holzsubstanz her bekannt, wo ebenfalls nach Nickel und Seliwanow[2] Durchtränkung des Holzes mit Natriumbisulfit das Eintreten der Wiesner'schen Farbenreaktionen mit Phloroglucin etc. verhindert. Auch hier werden die chromogenen Gruppen der Holzaldehyde Vanillin, Methylfurfurol durch das Natriumbisulfit gebunden.

Wenn man die durch $NaHSO_3$ entfärbte Lösung mit Amylalkohol durchschüttelt, so nimmt dieser einen Teil der Substanz auf, denn der amylalkoholische Extrakt regeneriert mit einem Tropfen konzentrierter Salzsäure, welche das Bisulfit unter SO_2-Entwicklung zerlegt, den Farbstoff in rein karminroter Nuance, während der Rest mit Salzsäure tief violettrote Fär-

[1] Zit. nach Grafe, Untersuchungen über d. Holzsubstanz. Ber. d. kais. Akad. d. Wissensch., Wien, Bd. CXIII, Abt. I, p. 8.

[2] Die erstere Möglichkeit scheint mir vorderhand wahrscheinlicher, da auch andere Aldehydreaktionen positiv ausfielen. Der definitive Beweis muß natürlich erst geführt werden.

bung zeigt. Ausschüttelungsversuche mit Äther, Chloroform, Schwefelkohlenstoff etc. verliefen erfolglos. Die Bisulfitverbindung stellt sich, auf dem Wasserbad eingedampft, als sirupöse, farblose oder leicht grünliche Masse dar, welche einen angenehm aromatischen Geruch besitzt. Unter der Vakuumglocke über Chlorcalcium vollkommen von Wasser befreit und dann mit absolutem Alkohol versetzt und digeriert, scheidet sie einen bräunlichen, in Wasser leicht löslichen Niederschlag aus, welcher die Säurereaktion des Anthokyans höchst intensiv violettrot zeigt, während die alkoholische Lösung weingelb aussieht und dieselbe Reaktion mit karminroter Nuance aufweist.

Um über die Natur der Bisulfitverbindung und damit über das vermutete Carbonyl im Molekül des Anthokyans Näheres zu erfahren, wurde zunächst die Bisulfitverbindung des reinen wasserlöslichen Anteils hergestellt. Das geschah in der Weise, daß die Substanz durch Digerieren mit gewöhnlichem Alkohol gelöst, sorgfältig neutralisiert und nun die intensiv blaurote Lösung vorsichtig mit frischem festem $NaHSO_3$ versetzt wurde. Nun wurde tropfenweise destilliertes Wasser hinzugefügt, bis eben Lösung eingetreten war, und dieser Vorgang unter fortwährendem Schütteln so lange, schließlich unter ganz gelindem Erwärmen fortgesetzt, bis nahezu völlige Entfärbung eingetreten war, worauf vom ungelöst gebliebenen Natriumbisulfit abfiltriert wurde. Die schwach rötliche oder gelbliche Flüssigkeit zeigte, mit einer konzentrierten Säure versetzt, unter SO_2-Entwicklung intensiv rotviolette Färbung. Nachdem der Alkohol durch Abdestillieren entfernt war, wurde am Wasserbad durch mehrere Stunden eingedampft, mit absolutem Alkohol versetzt und vom auskristallisierten $NaHSO_3$ abfiltriert. Dieses Verfahren wurde so lange wiederholt, bis absoluter Alkohol keine Fällung von Bisulfit mehr bewirkte. Dann wurde das Ganze im Vakuum über geschmolzenem Natriumsulfat stehen gelassen. Dabei resultierte eine sirupöse, grünlichbraune Masse von angenehm anisartigem Geruch (der Geruch des Ausgangsproduktes ist völlig verschieden, der alkohollösliche Anteil ist völlig geruchlos), welche die Anthokyanreaktionen ungemein intensiv zeigt. Der Vakuumdestillation unterworfen, ging nach einer geringen

Menge Wassers und Alkohols, die offenbar infolge Zersetzung eines kleinen Teiles des Anthokyanbisulfits nach SO_2 rochen und die Anthokyanreaktionen schwach zeigten, bei etwa 150° bis 160° unter 15 *mm* Vakuum eine schlecht destillierende, ölige, farblose Flüssigkeit über, welche mit einer Spur Säure violettrote Farbenreaktion zeigte.

Die Analyse des Anthokyanbisulfits wurde in der Weise durchgeführt, daß die Lösung des Bisulfits in Wasser in frisch bereitetes überschüssiges Bromwasser eingegossen wurde, wobei nicht eine Spur SO_2 sich entwickelte. Nachdem die Oxydation des Bisulfits vollzogen war, wurde anhaltend so lange gekocht, bis kein Brom mehr entwich, in die siedend heiße Lösung 1 cm^3 Salzsäure getan, sodann mit siedend heißer Chlorbaryumlösung tropfenweise versetzt, der Niederschlag am Wasserbad absitzen gelassen, filtriert und sorgfältig gewaschen, das Filter mit dem Niederschlag im Platintiegel naß verbrannt und das Baryumsulfat vorsichtig geglüht und gewogen.

4·3245 *g* Substanz gaben 1·7398 *g* $BaSO_4$, entsprechend 0·7799 *g* $NaHSO_3$, so daß also das Molekulargewicht des Bisulfits, nämlich 582 *g*, an $NaHSO_3$ 104·97 *g* hätte addieren müssen.

Das entspricht aber gerade einem Molekül $NaHSO_3 = 104{\cdot}13$, so daß das Bisulfit des wasserlöslichen Anthokyans $C_{20}H_{30}O_{13}$ eine Aldehydgruppe enthalten müßte. Gerade diese dürfte es auch sein, welche durch ihre Verbindungsfähigkeit die Anthokyanfärbungen hervorruft, denn durch ihre Bindung werden die bekannten Farbenreaktionen verhindert. Nun hat R. Karzel (in einer noch nicht veröffentlichten Arbeit) die Beobachtung gemacht, daß gewisse weiße Blüten oder farblose Blütenblätter, die sich noch in einem frühen Stadium der Entwicklung befinden, durch Betupfen mit konzentrierten Mineral- oder organischen Säuren mehr oder weniger intensiv rot werden. Es bleibt auf Grund der dargelegten Untersuchungen weiteren Arbeiten vorbehalten, zu ergründen, in welcher Weise die hypothetische Aldehydgruppe im Anthokyan der Karzel'schen farblosen Blüten, welche durch Säuren offenbar in Freiheit gesetzt wird, gebunden war. Es ist ferner von Interesse, daß das Licht bei vielen Pflanzen bei der Ausbildung des Anthokyans eine Rolle spielt, bei anderen

wieder nicht. So konnte erst neuerdings D. Katic[1] zeigen, daß bei *Hydrilla verticillata* (p. 19), *Hydrocharis morsus ranae* etc. in gewissen Nährlösungen (Knop'scher Lösung u. s. w.) die Farbe im Dunkeln sich überhaupt nicht ausbildete, während zugesetzter Rohrzucker, Traubenzucker, Fruchtzucker das Licht bezüglich Ausbildung der Farbe auffallenderweise ersetzen konnten. Es wird auf Grund der gewonnenen chemischen Anschauungen von der Natur des Anthokyans interessant sein, zu sehen, welche spaltende oder bindende Rolle das Licht bei der Aktivierung des schon im Dunkeln vorgebildeten, durch die Säurereaktion nachweisbaren Farbstoffes spielt.

Wenn man die streng neutrale Lösung des Farbstoffes in Wasser längere Zeit in flachen Schalen an der Luft stehen läßt, entwickelt sich eine reiche Kultur von *Penicillium* auf derselben. Nach mehreren Wochen Stehens zeigt ein abfiltrierter Tropfen der Lösung die Fehling'sche Probe nicht mehr; die braunrote Flüssigkeit wurde vom Pilz abfiltriert, vorsichtig zur Trockene eingedampft und das übrigbleibende Pulver mit absolutem Alkohol aufgenommen. Es löst sich darin vollständig auf, so daß man sich die Ansicht bilden könnte, der Pilz forme unter Spaltung des Glycosids die alkohollösliche Modifikation des Farbstoffes aus der wasserlöslichen. Es müssen sich aber dabei zweifellos weitergehende chemische Veränderungen vollzogen haben, da die Alkalireaktion des Anthokyans ausbleibt. Silbernitrat, welches übrigens auch durch die beiden reinen Modifikationen des Farbstoffes, wenn auch langsam, reduziert wurde, wird nunmehr augenblicklich stark reduziert, wobei Entfärbung der Flüssigkeit eintritt. Wahrscheinlich hat der Pilz alkoholische Hydroxyle des Moleküls, welche bereits Glan[2] durch Acetylierung konstatiert hat, zur Aldehydgruppe oxydiert.

Um zu erkennen, ob die Darstellung der Bisulfitverbindung irgend welche chemischen Änderungen des Farbstoffes mit

---

[1] Beitrag zur Kenntnis der Bildung des roten Farbstoffes (Anthocyan) in vegetativen Organen der Phanerogamen. Inauguraldissertation, Halle-Wittenberg, 1905.

[2] Glan, l. c., p. 20.

sich gezogen hatte, was ja von vorneherein nicht anzunehmen war, wurde ein Teil der Verbindung mit Alkohol versetzt und nun so viel Wasser zugefügt, daß gerade Lösung eintrat, dann eine unter Kühlung bereitete Auflösung von Schwefelsäure in Alkohol zufließen gelassen, bis sich keine schweflige Säure mehr entwickelte, gekocht, um die Zersetzung zu vervollständigen, und vom ausgeschiedenen Niederschlag abfiltriert. Die violettrote Lösung wurde sorgfältig mit alkoholischem Kali neutralisiert, bis ein wenig in die braune Lösung eingeleitete Kohlensäure Blaufärbung gab, zur Trockene eingedampft, mit gewöhnlichem angesäuerten Alkohol aufgenommen, abfiltriert und von neuem eingedampft. Es resultierte eine rote, körnige Masse, welche, der Elementaranalyse unterworfen, die Daten der Ausgangssubstanz ergab, so daß also vermutlich eine wirkliche Addition des Natriumbisulfits vorgelegen hatte. Die Reaktionen des Anthokyans waren bei diesem regenerierten Produkt dieselben wie bei dem Ausgangsmaterial. Diese Methode eignet sich also so wie das analoge Verfahren bei anderen Aldehyden auch zur Reindarstellung des Anthokyans.

Gegen Salpetersäure ist der Farbstoff sehr wenig widerstandsfähig; er wird durch mäßig konzentrierte Salpetersäure schon in der Kälte unter Gelbfärbung in Bezug auf die typischen Farbenreaktionen offenbar unter Oxydation zerstört. Ebensowenig resistent verhält er sich gegen alkalische Kaliumpermanganatlösung. Es wird Sache weiterer Untersuchungen sein, die Spaltungsprodukte, unter welchen schon Glan[1] Brenzkatechin, Protokatechusäure, ferner einen »vanilleartig« riechenden Körper aufgezeigt hatte, näher zu analysieren.

Die wichtigsten Resultate dieser vorläufigen Mitteilung sind folgende:

1. Das Anthokyan der Malvenblüten zeigt Reaktionen, welche von den von Weigert gefundenen einigermaßen abweichen. Es kann wohl als sicher hingestellt werden, daß die roten und blauen Farbstoffe in Blüten und Blättern, welche unter der Bezeichnung »Anthokyan« zusammengefaßt werden, wohl chemisch untereinander verwandte, keineswegs aber identische Individuen vorstellen.

---

[1] Glan, l. c., p. 19.

2. Die grüne Reaktion des Anthokyans, welche mit einem Überschuß an Alkali eintritt, dürfte entgegen der älteren Anschauung nicht oder wenigstens nicht in allen Anthokyanen auf die Anwesenheit von Gerbstoffen zurückzuführen, sondern eine dem Anthokyan selbst eigentümliche Eigenschaft sein.

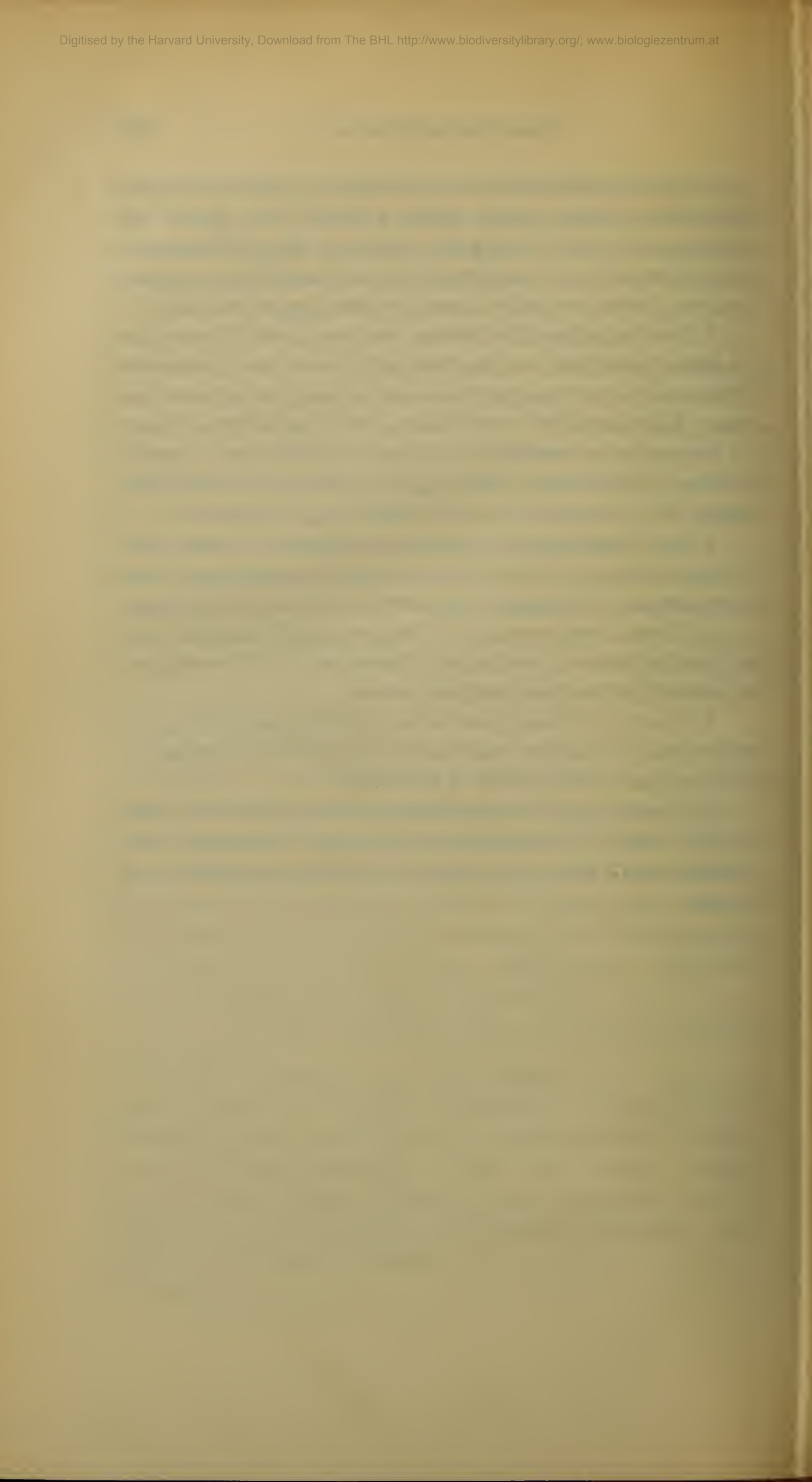
3. Das Anthokyan der Malve, welches durch Alkohol aus den Blüten extrahiert wurde, läßt sich durch ein bestimmtes Verfahren in zwei voneinander durch Lösungsverhältnisse und andere Eigenschaften verschiedene rote Farbstoffe zerlegen, von denen dem wasserlöslichen Körper, welcher als Glycosid erscheint, die Molekularformel $C_{20}H_{30}O_{13}$, dem alkohollöslichen, welcher kein Glycosid ist, die Formel $C_{14}H_{16}O_{6}$ zukommt.

4. Der Körper $C_{20}H_{30}O_{13}$ ist eine zweibasische Säure, enthält nach früheren Angaben alkoholische Hydroxyle und nach der vorliegenden Untersuchung vermutlich eine Aldehydgruppe.

5. Durch Anlagerung von Natriumbisulfit entsteht eine farblose Verbindung, welche beim Behandeln mit Mineralsäuren den ursprünglichen Farbstoff regeneriert.

6. Durch Schimmelpilze wird die Glycosidbindung gespalten und der Zucker verarbeitet, aber auch der Farbstoff in Bezug auf seine Alkalireaktion modifiziert.

7. Konzentrierte Schwefelsäure verändert wohl das Molekül, nicht aber die chromogene Gruppe des Farbstoffes; Salpetersäure und Kaliumpermanganat zerstören den Körper vollständig.



V. Grafe: Studien über das Anthokyan.

